

English Abstract of KR 1999-65347

(54) CANDIDA TROPICALIS SDB-101 MUTAGEN AND XYLITOL PREPARATION METHOD
BY THE SAME

(57) Abstract:

PURPOSE: *Candida tropicalis* SDB-101 as a new mutant strain is provided for being used in preparation of xylitol product from xylose. CONSTITUTION: *Candida tropicalis* SDB-101 mutant strain is deposited as KFCC-11005. The mutant strain is cultured in such as YM medium consisting of glucose, peptone, yeast extract and malt extract and is fermented in a specific medium comprised of 5-15% xylose, 0.1-2.5% yeast extract from nitrogen resource, 0.1-2.5% potassium phosphate(mono basic) and 0.001-0.5% magnesium sulfate. In order to improve productivity of xylitol, 5-20g/l glucose can be added to the fermentation medium. The xylitol is produced from xylose in the presence of the fermentation medium under pH4.0-6.0 and at 25-35deg.C.

COPYRIGHT 2001 KIPO

공개특허특1999-0065347

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl. 6
C12N 1/20

(11) 공개번호 특1999-0065347
(43) 공개일자 1999년08월05일

(21) 출원번호 10-1998-0000595
(22) 출원일자 1998년01월12일

(71) 출원인 주식회사 신동방 신명수
서울특별시 영등포구 양평동4가 2번지

(72) 발명자 성태경
서울특별시 동작구 사당4동 269-18
박군식

경기도 안산시 본오2동 769-16 202
안세천
경기도 안산시 사동 1344 신우아파트 606-502호
최길영

경기도 의왕시 오전동 841 벽암아파트 103동 401호
도무희

서울특별시 강남구 논현동 동현아파트 3동 201호

(74) 대리인 김연수
이철수

설사첨구: 있음

(54) 돌연변이주 켄디다 트로피칼리스 에스디비-101 및 이에 의한자일리를의 제조 방법

발명

본 발명은 신규한 미생물 및 이를 이용한 자일리를의 생산 방법에 관한 것으로서 신규한 돌연변이 균주인 켄디다 트로피칼리스 SDB-101을 이용하여 자일로즈로부터 고 수율의 자일리를 생산하는 방법에 관한 것이다.

감미료로 사용되고 있는 자일리를 생산하는 방법으로는 화학적인 방법과 미생물을 이용한 방법이 있었으나, 화학적 방법에 의한 경우 정제가 어렵고 수율이 낮으며 위험성 및 폐기물 문제가 있으며, 미생물에 의한 방법인 경우는 비용이 저렴하고 분리 정제 과정이 용이하나, 여전히 그 수율이 낮았는 바, 본 발명은 이러한 문제점을 해결하고자 발명된 것이다.

본 발명은 자일로즈로부터 자일리를 갖고 수율로 생산하는 돌연변이 균주를 생산하여 이를 이용하여 자일리를 갖고 수율로 생산하고자 하는 발명이다. 본 발명에 있어서, 돌연변이 균주인 켄디다 트로피칼리스 SDB-101는 자일로스 제조회사의 슬러지의 시료를 이용하여 성장 속도가 빠른 균주를 1차 선별하고, 이를 자일로스, 효모 추출물, 일인산칼륨으로 구성된 배지에서 자일리를 수율이 높은 균주를 2차 선별한 후 NTG를 첨가한 YM배지에서 이를 도말한 후 생성된 풀로니를 다시 분리하고 이를 2회 이상 반복하여 얻어진 돌연변이 균주를 자일로스를 포함하는 YM배지에 도말하여 풀로니를 다시 분리한 후 이를 수율이 높고 내열성이 높은 균주를 선별한다. 이 돌연변이 균주를 YM배지에서 배양 후 자일로스를 갖는 밸효 배지에서 배양하여 고 수율의 자일리를 얻는 과정으로 구성된다.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야 종래기술

본 발명은 신규한 미생물 및 이러한 신규의 미생물을 이용한 자일리톨의 제조 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 자연으로부터 분리한 균주를 돌연변이 시킨 신규한 켄디다 트로피칼리스 SDB-101(한국 미생물 보존협회 기록번호 KCFFC-11005호) 및 이를 이용하여 자일로스(xylose)로부터 자일리톨을 얻는 방법에 관한 것이다.

자일리톨은 1891년 척학자 에밀 피셔(Emit Fisher)에 의해 처음으로 알려진 후 1960년 이후 감미료로 사용되고 있는 당 알룰로스로 감미도는 설탕과 같고 용해시 용해 잠암이 크므로 시원한 청량감을 주고 쓰치 발생과 관련된 스트렙토류탄스(*Streptococcus mutans*)의 생육을 저해하여 쓰치 발생을 억제하는 효과가 있는 것으로 알려져 있을 뿐만 아니라, 인체 대사 과정에서 인슐린의 비의존성으로 당뇨 환자의 대체 당渣로 사용되는 특성이 있어서 제과 제품 특히 쥬, 치약등에 활발한 원료소재이므로 이러한 자일리톨에 대한 관심은 높아졌다.

그러나, 이러한 자일리톨은 제조나 관광등에 존재하기는 하나, 그 양이 미량인 바 이를 자연적으로 분리하는 것은 그다지 경제적이지 못한 단점이 있다.

자일리톨은 생산하는 방법으로는 화학적 방법 및 미생물을 이용한 방법이 공지되어 있다.

화학적으로 생산하는 방법으로는 자일로스가 다양 함유된 반 섬유소 가수분해물(hemicellulose hydrolysate)을 활용시키는 방법이 공지되어 있으나, 반응 후 자일리톨과 잔존 가수분해물과의 분리, 정제가 어렵고 그 수율이 낮으며 고열의 반응인 바, 위험성과 폐기물의 문제 등이다.

미생물에 의한 자일리톨의 생산은 효모의 경우 켄디다(Candida) 속의 텁뱅기(blankii), 파람시로시스(*parapsilosis*), 트로피칼리스(*tropicalis*), 와 사카로마이세스(*Saccharomyces*) 속의 품종(pombe) 등을 이용한 방법이 있으며, 세균의 경우 엔데로 박ter 리퀴파시엔스(*Enterbacter liquifaciens*), 코리네박테리움(*Corynebacterium*)과 마이코박테리움 스메그마티스(*Mycobacterium smegmatis*) 등을 이용한 방법이 있다. 미생물에 의한 방법은 화학적 방법에 비하여 비용이 저렴하고 식물성 원료의 자일로스가 포함된 가수분해물로부터 선별적으로 자일리톨로 전환시킬 수 있어 반응 후의 자일리톨의 분리 및 경제 과정이 용이하나, 그 수율이 낮은 단점 때문에 산업화하기에 어려움이 있었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

상기한 바와 같은 문제점을 해결하기 위하여 고안된 본 발명은 돌연 변이 균주인 켄디다 트로피칼리스 SDB-101을 이용하여 자일로스로 부터 고수율 및 고 생산성의 자일리톨을 얻는데 그 목적이 있다.

본 발명의 다른 목적은 신규한 돌연 변이 균주인 켄디다 트로피칼리스 SDB-101을 제공하는데 있다.

발명의 구성 및 작용

상기한 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 포도당을 이용하여 균체 증식을 유도하고 이를 이용하여 자일로스로 부터 자일리톨을 얻는다. 균주는 자일로스 회사인 화공(株, 중국)의 스리지로 부터 자일로스를 분해하여 자일리톨을 생산하는 균을 분리하여 그 중에서 수율과 생산성이 높은 균주를 1차로 선별하고 돌연변이시켜 야생균 주보다 수율 50%, 생산성 70%로 향상된 변이주를 제조하고 본 발명을 완성한다.

본 발명의 신규한 균주인 켄디다 트로피칼리스 SDB-101을 얻는 방법을 실시예를 통하여 상세히 설명하나, 이에 제한반지는 않는다.

[실시예 1]

자일로스 제조 회사의 스리지의 세료를 적당히 희석한 후 자일로스 10g/l, 웨튼 5g/l, 효모 추출물 3g/l, 아가 15g/l과 포함된 평판을 이용하여 30°C에서 성장속도가 빠른 균주를 1차 선별하고 이를 선별된 균주들을 자일로스 100g/l, 효모 추출물 5g/l, 일인산칼륨 5g/l로 구성된 배지에서 맷효시켜 맷효시까지 30시간 경과 후 자일리톨 수율이 높은 균주를 2차 선별하였다. 0.05~0.1% NTG(Nitroso Methyl Guanidine)을 첨가한 YM배지(포도당 20g/l, 웨튼 5g/l, 효모 추출물 3g/l, 맷효 추출물 3g/l)에 2차 선별한 야생균주를 도말 한 후 30°C에서 배양하여 생성된 풀로니를 분리하였다. 이 작업을 2차 이상 반복하여 얻어진 돌연변이주를 자외선에 조사하여 자일로스를 포함하는 YM배지에 도말하여 생성된 풀로니를 다시 분리하였다. 분리한 풀로니로부터 수율 및 생산성이 높고 내당성이 30% 이상인 균주를 최종적으로 선별하였다.

이러한 방법으로 선별된 캔디다 트로피칼리스 SDB-101의 균학적 특성은 하기와 같다.

1. 온도에 따른 균의 증식

20°C : + 30°C : + 37°C : + 42°C : -

2. 균의 증식

40% D-글루코즈 : +, 50% D-글루코즈 : -, 비타민이 제거된 배지 : -

3. 오소 분해 : -

4. 진분 형성 : -

5. Diazonium blue B 형성 반응 : -

6. 질산염의 이용 : -

7. 펜란트 : -

8. 탄소원의 이용

글루코즈 : + 갈락토즈 : + L-손보즈 : + 슈크로즈 : +

알포즈 : + 딕토즈 : - 트레한로즈 : + 세로비오즈 : +

멜리비오즈 : - 라파노즈 : + 베레지도즈 : + 가용성 전분 : +

D-자일로즈 : + L-아라비노즈 : + D-아라비노즈 : - D-리보즈 : -

D-팜노즈 : - 글리세롤 : + 에리쓰톨 : - 리비톨 : +

갈락티톨 : + D-칸니톨 : + D-솔비톨 : + D-글루시톨 : -

자일리톨 : - 이노시톨 : - 살리신 : - 이눌린 : -

DL-락트산 : - 숙신산 : + 시트르산 : + 포클산 : -

에탄올 : + 메탄올 : -

이러한 신규한 캔디다 트로피칼리스 SDB-101을 이용하여 하기와 같은 방법으로 자밀리톨을 생산한다.

중 배양은 냉동 보관된 둘연번이 균주를 YM배지 50ml가 들어 있는 250ml플라스크에 접종하여 220rpm으로 10시간 성장시킨다. 이러한 중 배양액의 10%를 밸효배지(최적 배지, 즉, 탄소원으로 자일로스 100g/l를 사용하였고 질소원으로는 효모 추출물 10g/l, 일인산칼륨 5g/l, 활산 마그네슘 0.2g/l으로 구성된 배지)에 접종한 후, 진탕배양 기로 220rpm에서 자일로스가 완전히 소모 될 때 까지 배양한다. 밸효조 배양은 밸효 초기에 200g의 자일로스가 함유된 배지 부피가 3L인 50mm 밸효조(한국발효기(국))를 사용한다.

자일로스의 자밀리를 및 균체 등의 능도 측정은 Carbohydrate Aminex-87C칼럼(Boi-Rad,USA)이 장착된 HPLC (WATERS,USA)의 Refractive Index Detector를 이용하여 측정하였다. 이때, 용매는 물을 사용하였고 온도는 85°C이고 유속은 0.6ml/min이다.

균체농도는 박도계를 이용하여 600mm에서 원탁도를 측정하여 미리 측정한 표준곡선을 이용하여 진조 중량으로 환산하였다. 용존 산소는 Ingold(Swiss,polarographic type)의 용존 산소 전극을 사용하여 측정하였다.

하기의 실시예를 통하여 본 발명을 좀더 상세히 설명한다.

[실시예2]

본 발명의 신규한 둘연번이 균주인 캔디다 트로피칼리스 SDB-101(KFCC-11005)을 YM 배지 50m가 들어있는 250ml플라스크에 접종하여 220rpm 30°C으로 10시간 배양하였다. 그후 이 중배양액을 밸효 배지(최적 배지)

50ml가 들어있는 250ml 플라스크에 접종한 후 전탕 배양기로 220rpm에서 30°C로 자일로스가 완전히 소모된 때 까지 배양하였다. 시간 경과에 따른 자일리톨의 생산을 살펴본 결과는 표 1과 같다.

[표 1]

(250ml 플라스크에서 초기 자일로스 농도가 100g/l인 경우 분리 균주의 시간에 따른 자일리톨의 생성)

배양시간 (시간)	균체농도(g/l)	자일로스(g/l)	자일리톨(g/l)
0	0.03	100	
10	3.5	92.0	0
20	5.21	52.7	37
30	5.50	12.6	73
32	5.37	0.0	82

자일로스 초기 농도가 50-150g/l인 경우 자일리톨의 생산 수율이 높았다.

[실시예 3]

배양 방법은 실시예 2와 동일하며 자일로스 100g/l, 질소원 5g/l, 일인산 칼륨 5g/l로 구성된 박효배지에서 발효시간 30시간 후 질소원이 자일리톨의 생산에 미치는 영향을 살펴본 결과는 표 2와 같다.

[표 2]

(250ml 플라스크에서 자일리톨의 생성에 미치는 질소원의 영향)

질소원	균체 농도(g/l)	자일리톨(g/l)
효모 추출물	5.10	72.8
효모원소	6.90	62.4
트립분	4.53	15.9
대두박	6.51	9.4
옥수수 침지액	7.24	5.4
백아 추출물	4.85	5.4
펩톤	3.31	6.8

질소원 중 효모 추출물이 가장 좋은 질소원임을 알 수 있다.

[실시예 4]

배양방법, 박효 배지는 실시예 2와 동일하며 이중 효모 추출물의 농도를 변화 시켜 30시간 동안 배양한 결과는 표 3과 같다.

[표 3]

(250ml 플라스크에서 효모 추출물 농도별 자일리톨의 생성량)

효모 추출물(g/l)	균체농도(g/l)	자일리톨(g/l)
1	1.2	0.0
5	5.5	73.0
10	5.2	84.8
20	3.4	72.8

효모 추출물의 농도가 5-25g/l 일 때 자일리톨 생산 수율이 높았다.

[실시예5]

배양 방법 및 배양 배지는 실시예 2와 동일하며 본 배양에서 발효 배지 중 일인산 칼륨의 농도를 변화시키면서 30시간 동안 배양한 결과를 표 4에 표시하였다.

[표4]

(250ml 플라스크에서 일인산칼륨 농도별 자일리톨의 생성량)

일인산칼륨(g/l)	균체농도(g/l)	자일리톨(g/l)
0	0.03	0.0
2	5.3	56.8
5	5.5	84.9
7	5.2	80.15

일인산칼륨의 농도가 2-25g/l인 경우 자일리톨 생산 수율이 높게 나타났다.

[실시예6]

배양방법 및 배양배지는 실시예 2와 동일하며 본 배양에서 발효 배지 중 황산 마그네슘의 농도를 변화시키면서 30시간 동안 배양한 결과를 표 5에 표시하였다.

[표5]

(250ml플라스크에서 황산 마그네슘 농도 별 자일리톨의 생성량)

황산 마그네슘(g/l)	균체농도(g/l)	자일리톨(g/l)
0.0	5.4	84
0.1	5.38	85.5
0.2	5.7	87.0
1.04	6.0	83.7

황산마그네슘의 농도가 0.1-5g/l인 경우 자일리톨 생산수율이 높게 나타났다.

[실시예7]

종 배양은 실시예 2와 같고, 본 배양은 쇠적 발효 배지(자일로스 100g/l, 효모 추출물 10g/l, 일인산칼륨 5g/l, 황산 마그네슘 0.2 g/l, 황산암모늄 5g/l)로 31인 5I발효조를 사용하여 배양하였다. 배양온도30°C에서 여러 pH별 실험을 수행하였다. pH를 변화시켜 자일로스가 완전히 소모 될 때까지 배양한 결과는 표 6과 같다.

[표6]

(5I발효조에서 pH별 자일리톨의 생성량)

pH	균체농도(g/l)	자일리톨(g/l)	배양시간(시간)
3.5	5.2	62.2	43
4.5	5.35	86.5	29
5.5	6.5	81.6	26
6.5	7.3	50.7	28

pH 4.0-6.0에서 자일리톨 생산 수율이 높았다.

[실시예 8]

배양 방법과 발효 배지는 실시예 7과 같고 본 배양에서 배양 pH는 4.5로 하여 배양 온도별 실험을 수행하였고 배양한 결과는 표 7과 같다.

[표7]

(51 발효조에서 온도별 자일리들의 생성량)

온도	균체 농도(g/l)	자일리들 농도(g/l)	배양시간(시간)
27	7.4	85.1	33
30	5.8	86.2	30
33	5.4	76.7	36
36	4.5	57.9	43
39	1.5	3.50	82

배양온도 23~35°C에서 자일리들을 생산 수율이 가장 높았다.

[실시예 9]

선정된 회적 배지에서 자일로스의 농도를 300g/l로 증가시켜 발효조에서 자일로스의 유가식 배양을 수행하였다. 배양은 발효 초기에 200의 자일로스가 함유된 배지 부피가 21인 51발효조(한국 발효기(주) 판네)를 사용하였다. 발효 과정 중에 175g의 자일로스가 함유된 250ml의 용액을 4번 (19.5시간, 26시간, 32시간, 37.5시간)간헐적으로 추가하여 최종 배양액의 부피는 3L이다. 용존 산소는 교반 속도를 300~600rpm으로 조절하여 초기에는 10%이상 유지시키고 균체 농도가 약 10g/l되는 시점에서 교반 속도를 150~400rpm으로 변화 시켜 용존산소를 제한하였다. 시간에 따른 자일리들의 생산은 표 8과 같다. 이러한 방법으로 300g/l의 자일로스로부터 4시간만에 252g/l의 자일리들을 얻었다.

[표8]

(발효 조에서 300g/l의 자일로스로부터 시간 별 자일리들의 생성량)

배양시간(시간)	균체 농도(g/l)	자일로스(g/l)	자일리들(g/l)
0	0.1	100	
6	0.56	99.5	
12	14.0	70	
20	21.9	2	58.2
20	17.8	79	52
25	21.8	2.1	119.5
25	18.5	73	106.3
32	22.6	2.8	175.0
32	19.8	67	159.6
36	21.8	5.7	211.6
36	18.6	63.9	195.5
41	20.5	0.0	252.0

본 실시예와 같이 용존 산소를 조절하면 용존 산소를 조절하지 않았을 때의 수율인 50%이하에 비하여 34%향상된 84%의 높은 수율을 얻을 수 있는 것이며, 자일로스 배지에 자일로스를 간헐적으로 첨가함으로서 수율을 좀 더 높일 수 있다.

[실시예10]

배양 방법 및 배양 배지는 실시예 2와 동일하며 플라스코에 균체를 접종한 후 30°C로 30시간까지 배양하였고 배지의 pH는 발효 초기에 5.0으로 조절한 후 조절하지 않았다. 이내 배지 성분은 포도당 0~30g/l, 자일로스 100g/l, 효모 추출물 5g/l, 황산암모늄 5g/l, 일회산칼슘 5g/l이었다. 발효 배지에 포도당 침가 농도에 따른 자일리를 의 생산을 살펴본 결과는 표 8과 같다.

[표9]

(250ml 플라스틱에서 포도당의 농도에 따른 자일리톨의 생성)

포도당(g/l)	균체농도(g/l)	자일리톨(g/l)
0	5.25	75.1
5	5.71	91.3
10	6.09	94.4
15	6.23	89.7
20	6.50	80.3
30	7.42	58.9

배양질과 포도당을 5~20g/l를 첨가하였을 경우 첨가하지 아니한 대조구에 비하여 수율이 높아지는 것을 알 수 있다.

[실시예11]

종 배양은 실시예2와 동일하게 균체 농축을 위한 전단계 배양으로서 포도당 배지(포도당 30g/l, 효모추출물 10g/l, 일인산칼륨 5g/l, 황산마그네슘 0.2g/l)가 3L 들어 있는 5L발효조를 사용하여 12시간 동안 배양하였다. 이 때, 배양 pH와 온도는 각각 5.0과 30°C였다. 시간에 따른 균체농도, 자일로스농도 및 자일리톨 농도는 표 10과 같다.

[표10]

(포도당으로 증식시킨 켄디다 트로피칼리스 SDB-101 의 농축균체를 이용한 자일리톨의
생성량)

시간(s)	균체농도(g/l)	자일로스 농도(g/l)	자일리톨 농도(g/l)
0	20.6	100.0	0.0
3.5	21.3	75.6	13.5
5	21.5	44.3	49.5
6	21.7	22.0	68.0
7	21.1	0.0	88.2

배양결과 켄디다 트로피칼리스 SDB-101에 의한 자일리톨 생산 수율은 88%이고 평균 용적 생산성은 14.5g-L⁻¹h⁻¹를 얻었다. 이러한 결과는 자일로스 대신 포도당에서 성장시킨 균체를 농축하면 균체 농도와 비례적으로 자일리톨의 생산성은 증가한다는 것을 나타낸다.

반영의 효과

이상과 같이, 감미료로 사용되고 있는 자일리톨은 천연적으로 생산하기 어려운 화합물인 바 이를 생산하는 종류의 기술이 다수 공지되어 있기는 하나, 화학적 방법 및 미생물을 이용한 방법 모두 단점이 갖고 있다. 따라서, 본 발명에 의하면 자일로스를 탄소원으로 이용 가능할 뿐만 아니라, 자일리톨 생산 수율이 높은 들연 번이 굽수인 켄디다 트로피칼리스 SDB-101을 생산하여 고 수율로 자일리톨을 생산하기에 이른 것이다. 뿐만 아니라, 화학적 방법에 비하여 비용이 저렴하고 경제성이 매우 용이한 효과를 아울러 갖는다.

(57) 청구의 범위

청구항1

들연번이 굽수인 켄디다 트로피칼리스 SDB-101(KFCC-11005호).

청구항2

제1항의 켄디다 트로피칼리스 SDB-101을 이용하여 자일로스로부터 자일리톨을 생산하는 방법.

청구항3

제 2항에 있어서, 켄디다 트로피칼리스 SDB-101의 배양 배지는 포도당, 페톤, 효모 추출물, 맥아 추출물로 구성

된 VM폐지이고, 밸효폐지는 자일로스, 첨소원으로 효모 주출물, 무기염으로 일인산칼륨과 황산마그네슘이 사용된 것을 특징으로 하는 자일로스로부터 자일리톨을 생산하는 방법.

청구항4

제 3항에 있어서, 밸효 폐지 조성이 자일로스 5-15%, 효모 주출물 0.1-2.5%, 일인산칼륨0.1-2.5% 및 황산마그네슘 0.001-0.5%인 것을 특징으로 하는 자일로스로부터 자일리톨을 생산하는 방법.

청구항5

제 3항에 있어서, 자일로스 폐지에 포도당을 5-20g/l를 첨가하여 자일리톨 생산성을 높이는 것을 특징으로 하는 자일로스로부터 자일리톨을 생산하는 방법.

청구항6

제 3항에 있어서, 자일로스 폐지는 배양 pH가 4.0-6.0이고 배양온도가 25-35°C인 것을 특징으로 하는 자일로스로부터 자일리톨을 생산하는 방법.

청구항7

제 3항에 있어서, 자일로스 폐지에 자일로스를 간헐적으로 첨가하여 자일리톨의 생산성을 높이는 것을 특징으로 하는 자일로스로부터 자일리톨을 생산하는 방법.

청구항8

제 3항에 있어서, 밸효 초기 균체 증식기에서는 높은 용존 산소농도를 유지하고 자일리톨 생산기에는 용존 산소농도를 계한하여 자일리톨의 생산성을 높이는 것을 특징으로 하는 자일로스로부터 자일리톨을 생산하는 방법.